

Временное руководство ВОЗ

Лабораторные исследования на коронавирусную болезнь 2019 г. (COVID-19) при подозрении на заболевание людей

2 марта 2020 года

Введение

Ряд коронавирусов могут инфицировать людей: глобально эндемичные коронавирусы человека HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-NKUI и HCoV-OC43, которые вызывают легкое респираторное заболевание, а также зоонозный коронавирус Ближне-Восточного респираторного синдрома (MERS-CoV) и коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), которые имеют более высокий уровень летальности. В декабре 2019 года в Ухане, Китай, была выявлена группа пациентов с новым коронавирусом (1). Первоначально предварительно названный новым коронавирусом 2019 года (2019-nCoV), вирус был назван SARS-CoV-2 Международным комитетом таксономии вирусов (ICTV) (2). Этот вирус может вызывать заболевание под названием коронавирусная болезнь 2019 года (COVID-19). ВОЗ называет его как вирус COVID-19 в своей текущей документации.

Цель этого документа - предоставить временное руководство лабораториям и заинтересованным сторонам, связанным с лабораторными исследованиями у пациентов на вирус COVID-19.

При составлении настоящего временного руководства были учтены существующие документы ВОЗ, включая временное руководство по лабораторному тестированию на MERS (3-9). Информация о заражении человека вирусом COVID-19 постоянно развивается, и ВОЗ продолжает следить за развитием событий и при необходимости пересматривать рекомендации. Отзывы приветствуются и могут быть отправлены на WHElab@who.int.

2. Руководящие принципы лабораторных исследований у пациентов, которые соответствуют определению подозрительного случая

Решение о проведении исследований должно основываться на клинических и эпидемиологических факторах и быть связано с оценкой вероятности заражения. ПЦР-тестирование бессимптомных или слабо симптоматических контактов может быть рассмотрено при оценке лиц, которые имели контакт с больным COVID-19. Скрининг-протоколы должны быть адаптированы к местной ситуации. Определения случаев регулярно пересматриваются и обновляются по мере поступления новой информации. Определение подозрительного случая ВОЗ см. в «Глобальном надзоре за инфекцией человека коронавирусной болезнью (COVID-2019)» (10).

Быстрый сбор и тестирование соответствующих образцов от пациентов, отвечающих определению подозрительного случая для COVID-19, являются приоритетом для клинического ведения и контроля вспышки и должны проводиться под руководством лабораторного эксперта. Подозрительные случаи должны быть проверены на наличие вируса с помощью тестов амплификации нуклеиновых кислот (NAAT), таких как ОТ-ПЦР.

Если тестирование на COVID-19 еще не доступно на национальном уровне, образцы должны быть переданы. Список референс-лабораторий ВОЗ, предоставляющих подтверждающее тестирование на COVID-19 и инструкции по доставке доступны в разделе 4 следующей веб-страницы:

<https://www.who.int/emergencies/diseases/novelcoronavirus-2019...>

Если это требуется для определения тактики ведения больного, пациенты должны быть проверены на наличие других респираторных патогенов с использованием рутинных лабораторных процедур, как рекомендуется в местных руководствах по лечению внебольничной пневмонии. Дополнительные испытания не должны задерживать

тестирование на COVID-19. Поскольку могут возникнуть сопутствующие инфекции, все пациенты, которые соответствуют определению подозрительного случая, должны быть проверены на наличие вируса COVID-19 независимо от того, обнаружен ли другой респираторный патоген.

В раннем исследовании в Ухане средний инкубационный период для COVID-19 составлял 5,2 дня у 425 больных, хотя он сильно различается у разных людей (11,12,13). Схемы выделения вируса еще недостаточно изучены, и необходимы дальнейшие исследования, чтобы лучше понять сроки, компартиментализацию и количество выделения вируса для обеспечения оптимального сбора образцов. Хотя респираторные пробы имеют наибольший «урожай», вирус может быть обнаружен в других образцах, включая стул и кровь (14,15,16). Необходимо соблюдать местные правила относительно информированного согласия пациента или опекуна на сбор образцов, тестирование и, возможно, будущие исследования.

3. Сбор и отправка образцов

Процедуры безопасности при сборе образцов

Убедитесь, что используются соответствующие СОП и персонал обучен надлежащему сбору, хранению, упаковке и транспортировке образцов. Все образцы, собранные для лабораторных исследований, должны считаться потенциально заразными.

Убедитесь, что медицинские работники, которые собирают образцы, неукоснительно соблюдают рекомендации по профилактике и контролю инфекций. Было опубликовано специальное временное руководство ВОЗ: «Профилактика инфекции и контроль во время оказания медицинской помощи при подозрении на инфицирование новым коронавирусом (nCoV), временное руководство, январь 2020 г.»(17) и «Временное руководство ВОЗ по лабораторной биобезопасности, связанной с nCoV-2019» (18).

Вставка 1. Методы биобезопасности в лаборатории

Тестирование на клинических образцах от пациентов, отвечающих определению подозрительного случая, должно быть выполнено персоналом соответствующим образом оборудованной лаборатории, обученным соответствующим техническим процедурам и процедурам безопасности. Национальное руководство по лабораторной биобезопасности должно соблюдаться при любых обстоятельствах. Пока все еще ограниченная информация имеется о риске, связанном с COVID-19, но все процедуры должны проводиться с учетом оценки риска. Обработка образцов для молекулярного тестирования требует BSL-2 или эквивалентных условий. Попытки культивировать вирус требуют как минимум BSL-3. Для получения дополнительной информации, связанной с оценкой риска COVID-19, см. специальный временный руководящий документ: Руководство по лабораторной биобезопасности, связанной с 2019-nCoV (18).

Образцы, которые являются потенциально инфекционными материалами (PIM) для полиомиелита, должны обрабатываться и храниться, как описано в документе ВОЗ «Руководство по минимизации рисков для учреждений: сбор, обработка или хранение потенциально инфекционных материалов для полиовирусов (руководство PIM)»(23). Для общей лаборатории руководящие указания по биобезопасности, см. Руководство ВОЗ по биобезопасности в лаборатории, 3-е издание, до выхода 4-го издания.

Образцы для сбора

Как минимум, респираторный материал должен быть собран:

- образцы из верхних дыхательных путей:

мазок из носоглотки и ротоглотки

или смывы от амбулаторных больных

- и/или образцы из нижних дыхательных путей:

мокрота (если есть) и/или эндотрахеальный аспирационный или бронхоальвеолярный лаваж у пациентов с более тяжелой респираторной болезнью. (Обратите внимание на

высокий риск аэрозолизации; необходимо строго придерживаться процедуры профилактики и контроля инфекции).

Дополнительные клинические образцы могут быть собраны, поскольку вирус COVID-19 был обнаружен в крови и стуле, как и коронавирусы, ответственные за SARS и MERS (14, 16, 19-21). Продолжительность и частота выделения вируса COVID-19 с калом и, возможно, мочой неизвестна. От умерших больных исследуют аутопсийный материал, включая легочную ткань. У выживших пациентов парные сыворотки (острая и реконвалесцентная) могут быть полезны для ретроспективного определения случаев, когда станут доступны серологические анализы.

Дополнительные рекомендации по материалам для сбора, включая тестирование бессимптомных лиц, можно найти в таблице 1.

Упаковка и доставка клинических образцов

Образцы для обнаружения вируса должны поступить в лабораторию как можно скорее после сбора. Правильное обращение с образцами во время транспортировки имеет важное значение. Образцы, которые можно быстро доставить в лабораторию, можно хранить и отправлять при температуре 2-8 ° C. Когда существует вероятность задержки во время транспортировки образцов в лаборатории, настоятельно рекомендуется использовать вирусную транспортную среду. Образцы могут быть заморожены до -20 ° C или в идеале до -70 ° C и отправлены на сухом льду, если ожидаются дальнейшие задержки (см. таблицу 2). Важно избегать повторного замораживания и оттаивания образцов.

Транспортировка образцов в пределах национальных границ должна соответствовать применимым национальным нормам. Международная перевозка потенциально содержащих вирус COVID-19 образцов должна осуществляться в соответствии с Типовыми правилами ООН и любыми другими применимыми правилами в зависимости от вида транспорта. Более подробную информацию можно найти в [“WHO Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2019-2020”](#)(22) и [“WHO interim guidance for laboratory biosafety related to 2019-nCoV”](#)(18).

Необходимо обеспечить хорошую связь с лабораторией и предоставить необходимую информацию

Оповещение лаборатории перед отправкой образцов способствует правильной и своевременной обработке образцов и своевременной отчетности. Образцы должны быть правильно маркированы и сопровождаться диагностическим запросом по форме (шаблон в Приложении I).

4. Лабораторные исследования на вирус COVID-19

Лаборатории, проводящие тестирование на вирус COVID-19, должны строго придерживаться соответствующих правил биобезопасности.

Тесты амплификации нуклеиновых кислот (NAAT) для вируса COVID-19

Рутинное подтверждение случаев COVID-19 основано на обнаружении уникальных последовательностей вирусной РНК с помощью NAAT, таких как полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени (rRT-PCR) с подтверждением секвенированием нуклеиновых кислот, когда это необходимо. До сих пор целевые вирусные гены включают гены N, E, S и RdRP. Примеры используемых протоколов можно найти по ссылке. Извлечение РНК должно проводиться в боксе биобезопасности BSL-2 или аналогичном устройстве. Термическая обработка образцов перед экстракцией РНК не рекомендуется.

Лабораторное подтверждение случаев заболевания с помощью NAAT в районах, где циркуляция вируса COVID-19 не выявлена. Чтобы считать случай лабораторно подтвержденным с помощью NAAT в районе без циркуляции вируса COVID-19, необходимо одно из следующих условий:

- Положительный результат NAAT для по меньшей мере двух различных мишеней в геноме вируса COVID-19, из которых по меньшей мере одна мишень предпочтительно является специфичной для вируса COVID-19, с использованием проверенного анализа (поскольку в настоящее время другие SARS-подобные коронавирусы не циркулируют в человеческой популяции, подлежит обсуждению, должна ли она быть специфической для COVID-19 или SARS-подобного коронавируса); **ИЛИ**

- Один положительный результат NAAT на присутствие бета-коронавируса, и вирус COVID-19 далее идентифицируют путем секвенирования частичного или целого генома вируса до тех пор, пока /не будет установлено, что/ последовательность мишени больше или отличается от ампликона, исследованного в используемом анализе NAAT.

Когда имеются противоречивые результаты, у пациента должны быть повторно взяты образцы и, если необходимо, проведено секвенирование вируса из исходного образца или ампликона, полученного в результате соответствующего анализа NAAT, отличающегося от первоначально использованного анализа NAAT, для обеспечения надежного результата теста. Лабораториям настоятельно рекомендуется получить подтверждение любых неожиданных результатов в международной референс лаборатории.

Лабораторно подтвержденный NAAT случай в районах с установленной циркуляцией вируса COVID-19

В районах, где вирус COVID-19 широко распространен, может быть принят более простой алгоритм, в котором, например, считается достаточным скрининг с помощью rRT-PCR для одной мишени.

Один или несколько отрицательных результатов не исключают возможность заражения вирусом COVID-19. Ряд факторов может привести к отрицательному результату у инфицированного человека, в том числе:

- низкое качество образца, содержащего мало материала пациента (в качестве контроля рассмотрите возможность определения наличия достаточного количества ДНК человека в образце, включив мишень человека в ПЦР-тестирование)
- образец был собран поздно или очень рано от момента заражения
- образец не был обработан и отправлен соответствующим образом
- технические причины, присущие тесту, например, вирусная мутация или ингибирование ПЦР.

Если у пациента с высоким показателем подозрения на вирусную инфекцию COVID-19 получен отрицательный результат, особенно когда были собраны только образцы из верхних дыхательных путей, следует собрать и протестировать дополнительные образцы, в том числе из нижних дыхательных путей, если это возможно.

Каждый раунд NAAT должен включать как внешний, так и внутренний контроль, и лаборатории должны участвовать в схемах внешней оценки качества, когда они становятся доступными. Лабораториям, которые заказывают свои собственные праймеры и зонды, также рекомендуется проведение входного тестирования/проверки функциональности и потенциальных загрязнителей.

Лабораториям с ограниченным опытом тестирования на вирус COVID-19 рекомендуется работать с лабораториями с большим опытом в этой области, чтобы подтвердить первоначальные результаты своих испытаний и улучшить свои собственные показатели. Для лабораторий, тестирующих на вирус COVID-19 в странах, где COVID-19 ранее не циркулировал, ВОЗ рекомендует подтвердить результаты тестирования для:

- первые 5 положительных образцов,
- первые 10 отрицательных образцов (собранных от пациентов, которые соответствуют определению случая)

направив их в одну из справочных лабораторий ВОЗ, предоставляющих подтверждающее тестирование на COVID-19. Для национальных лабораторий COVID-19, если для подтверждения тестов требуется поддержка при отправке образцов в одну из референс-

лабораторий, имеется фонд доставки ВОЗ. Пожалуйста, обратитесь к [WHO website for the most updated list of reference laboratories and shipment instructions](#).

Серологическое тестирование

Серологические исследования могут помочь в расследовании продолжающейся вспышки и ретроспективной оценке уровня атаки или степени вспышки. В тех случаях, когда анализы NAAT являются отрицательными и имеется сильная эпидемиологическая связь с инфекцией COVID-19, парные образцы сыворотки (в острой и реконвалесцентной фазах) могут поддержать диагноз, как только будут получены проверенные серологические тесты. Образцы сыворотки могут быть храниться для этих целей.

Перекрестная реактивность к другим коронавирусам может быть сложной (24), но в настоящее время разрабатываются коммерческие и некоммерческие серологические тесты. Были опубликованы некоторые исследования с серологическими данными по COVID-19 в клинических образцах (25, 26).

Секвенирование вируса

Помимо подтверждения наличия вируса, регулярное определение последовательности образцов из клинических случаев может быть полезным для мониторинга мутаций вирусного генома, которые могут повлиять на эффективность медицинских контрамер, включая диагностические тесты. Секвенирование полного генома вируса может также помочь в молекулярно-эпидемиологических исследованиях. Доступны многие базы данных публичного доступа для депонирования данных генетических последовательностей, включая GISAID, которая предназначена для защиты прав подающей стороны(27).

Вирусная культура

Выделение вируса не рекомендуется в качестве обычной диагностической процедуры.

6. Сообщение о случаях и результатах испытаний

Лаборатории должны следовать требованиям национальной отчетности. В целом, о всех результатах тестов, положительных или отрицательных, следует немедленно сообщить национальным органам. Государствам-участникам ММСП напоминают об их обязательствах делиться с ВОЗ соответствующей информацией в области общественного здравоохранения о событиях, о которых они уведомили ВОЗ, используя инструмент принятия решений в Приложении 1 к ММСП (2005 г.) (28).

7. Исследования в направлении улучшения обнаружения вируса COVID -19

Многие аспекты вируса и болезни до сих пор не поняты. Для лучшего руководства потребуется лучшее понимание. Например:

Вирусная динамика: оптимальное время и тип клинического материала, который подлежит отбору, для молекулярного тестирования.

- Динамика иммунологического ответа
- Тяжесть заболевания в разных популяциях, например, по возрасту.
- Связь между концентрацией вируса и тяжестью заболевания
- Продолжительность выделения и связь с клинической картиной (например, клиническое выздоровление происходит при биологическом освобождении от вируса, или выделение продолжается, несмотря на клиническое улучшение)
- Разработка и валидация адекватных серологических анализов
- Сравнительные исследования доступных молекулярных и серологических анализов.
- Оптимальный процент положительных случаев, требующих секвенирования для мониторинга мутаций, которые могут повлиять на эффективность молекулярных тестов.

ВОЗ поощряет обмен данными для лучшего понимания и, таким образом, борьбы со вспышкой COVID-19, а также для разработки контрмер.

Таблица 1. Образцы, которые должны быть собраны у пациентов с симптомами и контактных лиц

	Тест	Тип образца	Временные параметры
Больной	NAAT	Нижние дыхательные пути: мокрота, аспират, лаваж Верхние дыхательные пути: мазки из носоглотки и ротоглотки - смывы/аспират из носоглотки Следует иметь в виду кал, цельную кровь, мочу и, аутопсийный материал	При появлении симптоматики. Возможен повторный отбор проб для контроля клиренса. Необходимы дальнейшие исследования для определения эффективности и надежности повторного отбора проб.
Больной	Серологические тесты	Сыворотка для серологического тестирования при наличии и валидации /тестов/	Парные образцы необходимы для подтверждения, первоначальный образец отбирается в первую неделю болезни, а второй идеально собрать через 2-4 недели (оптимальные сроки для реконвалесцентного образца должны быть установлены).
Контактные лица (во время вспышек, связанных с медицинским центром, или в других местах, где у контактных лиц есть симптомы, или где у бессимптомных контактов был интенсивный	NAAT	мазки из носоглотки и ротоглотки	В пределах инкубационного периода у последнего зарегистрированного контактного лица

контакт с больным COVID-19)			
	Серологические тесты	Сыворотка для серологического тестирования при наличии и валидации /тестов/	Базовая сыворотка, взятая как можно раньше в течение инкубационного периода у контакта, и реконвалесцентная сыворотка, взятая через 2-4 недели после последнего контакта (необходимо установить оптимальные сроки для реконвалесцентного образца).

Таблица 2. Сбор и хранение образцов (адаптировано из источников 6 и 29,30)

Тип образца	Материал для сбора	Т-ра хранения до тестирования в лаборатории внутри страны	Рекомендуемая т-ра транспортировки в соответствии с ожидаемым временем транспортировки
Мазок из носоглотки и ротоглотки	Тампоны из дакрона или полиэстера	2–8 °С	2–8 °С, если до 5 сут. — 70 °С (сухой лед), если свыше 5 дней
Бронхоальвеолярный лаваж	Стерильный контейнер*	2–8 °С	2–8 °С, если до 2 сут. — 70 °С (сухой лед), если свыше 2 дней
(Эндо)трахеальный аспират, аспират из носоглотки или промывные воды из носа	Стерильный контейнер	2–8 °С	2–8 °С, если до 2 сут. — 70 °С (сухой лед), если свыше 2 дней
Мокрота	Стерильный контейнер	2–8 °С	2–8 °С, если до 2 сут. — 70 °С (сухой лед), если свыше 2 дней
Биоптат или аутопсийный материал, включая легкие	Стерильный контейнер с солевым раствором или транспортной средой для вирусов	2–8 °С	2–8 °С, если до 24 час. — 70 °С (сухой лед), если свыше 24 часов
Сыворотка	Пробирки для отделения сыворотки (взрослые: собрать 3-5 мл цельной		2–8 °С, если до 5 сут. — 70 °С (сухой лед), если свыше 5 дней

	крови)		
Цельная кровь	Пробирка для сбора	2–8 °С	2–8 °С, если до 5 сут. — 70 °С (сухой лед), если свыше 5 дней
Кал	Контейнер для кала	2–8 °С	2–8 °С, если до 5 сут. — 70 °С (сухой лед), если свыше 5 дней
Моча	Контейнер для мочи	2–8 °С	2–8 °С, если до 5 сут. — 70 °С (сухой лед), если свыше 5 дней

* Для транспортировки образцов для обнаружения вируса используйте вирусную транспортную среду (VTM), содержащую противогрибковые и антибиотические добавки. Избегайте повторного замораживания и оттаивания образцов. Если VTM недоступна, вместо нее можно использовать стерильный физиологический раствор (в этом случае продолжительность хранения образца при 2-8 °С может отличаться от указанной выше). Помимо конкретных материалов для сбора, указанных в таблице, необходимы другие материалы и оборудование: например, транспортные контейнеры и пакеты для сбора образцов и упаковки, холодильники и холодные пакеты или сухой лед, стерильное оборудование для взятия крови (например, иглы, шприцы и пробирки), этикетки и перманентные маркеры, СИЗ, материалы для обеззараживания поверхностей.

Приложение I

Форма запроса на лабораторное исследование на вирус COVID-19

Информация о том, кто обращается

Название лаборатории, больницы и т.д.

Учреждение*

Врач

Адрес

Номер телефона

Определение случая: Подозрительный Вероятный

Информация о больном

ФИО

ID больного Дата рождения, возраст:

Адрес

Пол М Ж Неизвестен

Номер телефона

Информация об образце

Тип Мазок из носо-/ротоглотки Бронхоальвеолярный лаваж Эндотрахеальный аспират

Назофарингеальный аспира Смыв из носа Мокрота Ткань легкого

Сыворотка Цельная кровь моча Кал Другое:

Все собранные образцы следует рассматривать как потенциально инфекционные, и вы должны связаться с референс-лабораторией перед отправкой образцов.

Все образцы должны быть отправлены в соответствии с транспортными требованиями категории В.

Пожалуйста, поставьте галочку, если ваш клинический образец посмертный

Дата отбора

Время отбора

Статус приоритета

Клинические детали

Дата появления симптомов:

Была ли у пациента недавняя поездка в пострадавший район в анамнезе?

да

нет

страна

Дата возвращения

Был ли у пациента контакт с подтвержденным случаем?

да нет неизвестно другие контакты /с возможным источником инфекции/:

Дополнительные комментарии